URIDYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT UND KINETISCHE DATEN IN AMNIONZELLEN UND FIBROBLASTEN UNTER VERSCHIEDENEN WACHSTUMSBEDINGUNGEN

Harald Henseleit

1979

Aus der Kinder - Klinik der Universität München
im Dr. v. Haunerschen Kinderspital

Vorstand: Prof. Dr.med.Klaus Betke

URIDYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT UND KINETISCHE DATEN IN AMNIONZELLEN UND FIBROBLASTEN UNTER VERSCHIEDENEN WACHSTUMSBEDINGUNGEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Harald Henseleit

aus

München

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr.J.Schaub
Mitberichterstatter: Prof. Dr.K.Betke
Dekan: Prof. Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 11. 1979

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einführung	1
Methoden	
1. Zellkultivierung	7
2. Aufbereitung der Fibroblasten- und Amnionzellkulturen	8
3. Leukozytenpräparation	8
4. Proteinbestimmung	9
5. Enzymbestimmung	10
6. Vorbereitung der DEAE-Zellulose	11
7. Säulenchromatographie	12
Material	
1. Zellkultivierung	14
2. Zellaufbereitung	14
3. Proteinbestimmung	15
4. Enzym-Testansatz	15
5. Säulenchromatographie	15
Ergebnisse	
1. Kinetische Daten	16
a) pH-Optima	16
b) Michaelis-Menten-Kinetik	16
2. Enzymaktivitäten und Proteinwerte während der Zellkultur	17
3. Enzymaktivitäten und Proteinwerte unter dem Einfluß von Glucose und Galaktose	17
Diskussion	20
Zusammenfassung	25
Literaturverzeichnis	26
Abbildungen 1 - 7	30
Erläuterungen zu den Abbildungen	39
Lebenslauf	41

EINFÜHRUNG

Galaktosämie ist eine angeborene Stoffwechselerkrankung, die autosomal rezessiv vererbt wird (13, 45). Exogene Galaktose wird im Leloir-Weg, der den Umbau von Galaktose zu Glucose beschreibt, zunächst mit Hilfe der Galaktokinase (E.C.2.7.1.6.) und ATP als Phosphatdonator in Stellung 1 phosphoryliert. Das Reaktionsprodukt Galaktose-1-Phosphat reagiert mit UDP-Glucose unter Bildung von UDP-Galaktose und Glucose-1-Phosphat. Die durch das Enzym Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (E.C.2.7.7.12.) vermittelte Reaktion besteht also in einem Austausch von Galaktose und Glucose am Uridindiphosphat. UDP-Galaktose kann dann in einer Epimerasereaktion von der UDP-Galaktose-4-Epimerase (E.C.5.1.3.2.) in UDP-Glucose umgelagert werden (16, 9).

Infolge fehlender oder verminderter Aktivität der Urydyltransferase kommt es bei der Galaktosämie zu einer Ansammlung von Galaktose, Galaktose-1-Phosphat und Galaktitol. Galaktitol ist Reaktionsprodukt einer Enzymreaktion, in der durch eine Aldose-Reduktase die C-1-Aldehydgruppe der Galaktose reduziert wird.

Durch toxische Wirkung dieser Metaboliten auf den Intermediärstoffwechsel werden die klinischen Manifestationen der Galaktosämie hervorgerufen (39).

Bei der klassischen Form der Galaktosämie fehlt die Uridyltransferase im Organismus des homozygoten Defektträgers vollständig oder es ist nur minimale Aktivität nachweisbar und es entwickelt sich nach der ersten Milchmahlzeit ein typisches klinisches Bild, das sich in Erbrechen, schwerer Gelbsucht, Hepatomegalie, Blutungsneigung, Infektanfälligkeit, Diarrhoe und Exsikkose äußert. Bleibt diese Krankheit unerkannt, mündet die Symptomatik, falls diese kritische Phase überlebt wird, in die klassische Trias: Leberzirrhose, geistige Retardierung und Linsentrübung. Außerdem sind Hypoprothrombinämie, Proteinurie, Aminoacidurie und Galakturie zu beobachten.

Über den Wirkmechanismus, durch den die vielfältige klinische Symptomatik hervorgerufen wird, ist noch wenig bekannt. Galaktose-1-Phosphat scheint das hauptverantwortliche toxische Agens darzustellen. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, daß Leberschäden, geistige Retardierung und Aminosäurenausscheidung im Urin beim Galaktokinasemangel nicht anzutreffen sind.

An dieser Stelle soll die Möglichkeit eines Alternativstoffwechselweges für den Galaktosämiker beschrieben werden:

1. Gal-1-Phosphat + UTP $\rightleftharpoons$ UDP-Galaktose + PPi (Pyrophosphorylase)
2. UDP-Galaktose $\rightleftharpoons$ UDP-Glucose (Epimerase)
3. UDP-Glucose + PPi $\rightleftharpoons$ Glucose-1-Phosphat + UTP (Pyrophosphorylase)

Dieser Umbauweg, der mit Schritt 2 und 1 die endogene Galaktosesynthese aus UDP-Glucose beschreibt, scheint im Normalfall für die Verwertung exogener Galaktose nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Beim Uridyltransferasemangel wird er zum Hauptweg, indem er die Umwandlung von Galaktose-1-Phosphat zu Glucose-1-Phosphat ermöglicht (15, 29, 8, 5).

Die beiden Pyrophosphorylasen aus Schritt 1 und 3 sind dabei strukturell und immunologisch identisch. Die Affinität des Enzyms gegenüber Glucose-1-Phosphat ist größer als gegenüber Galaktose-1-Phosphat.

Mit den gleichen Enzymschritten, nur in umgekehrter Reihenfolge, ist das Auftreten von Galaktose-1-Phosphat im Organismus von Galaktosämie-Kranken zu erklären, die vollständig galaktosefrei ernährt werden (12, 35).

Die Pathogenese der Kataraktbildung ist gut bekannt. Galaktose sammelt sich im Kammerwasser an, dringt in die Augenlinse ein und wird durch die dort vorhandene Aldose-Reduk-

tase zu Galaktitol reduziert. Dieser mehrwertige Alkohol ist osmotisch wirksam und bewirkt über einen Zusammenbruch der Kationenpumpe eine Wasseraufnahme in die Linse mit anschließender Quellung der Fasern (27).

Der erste Patient mit Galaktosämie wurde 1908 von Reuss (30) beschrieben und 1917 vermutete Göppert einen genetischen Defekt, der dieser Störung zugrunde liegt (10).

Mason und Turner prägten 1935 den Ausdruck "chronic galactemia" und sahen als Ursache einen Enzymblock der Leber bei der Umwandlung von Galaktose zu Glykogen. Die erste klare Aussage, daß Galaktosämie als eine angeborene Stoffwechselstörung betrachtet werden muß, stammt von Gorter aus dem Jahr 1951 (11).

Die einzelnen Schritte der Galaktoseverwertung in Hefe wurden von Kosterlitz 1943, Leloir et al. 1950 und Kalckar et al. 1953 aufgezeigt (18, 4, 17). Es zeigte sich dann, daß die gleichen enzymatischen Schritte auch für den menschlichen Organismus gelten.

Bisher sind sechs Varianten dieser Erbkrankheit beschrieben worden. Als Beispiel seien zwei Formen kurz erwähnt. Bei der 1965 von Beutler et al. geschilderten "Duarte-Variante" (2) findet man bei Heterozygotie eine um 50 % herabgesetzte Aktivität der Uridyltransferase. So kann man die Unterscheidung, ob die homozygote Form der Duarte-Variante oder die heterozygote Form der klassischen Galaktosämie vorliegt, nur durch die Untersuchung des Erbganges in der Familie oder mittels Elektrophorese (23) treffen, da in beiden Fällen die Hälfte normaler Enzymaktivität und ein klinisch unauffälliges Bild anzutreffen ist. Bei der von Ng (26) erstmalig beschriebenen "Los Angeles Variante" findet man in Erythrozyten bei Homozygotie um etwa 50 %, bei Heterozygotie um etwa 10 % der Norm erhöhte Werte.

Kinder, die homozygote Defektträger der klassischen Form sind, müssen so früh wie möglich von Milch auf milchzuckerfreie Nahrung umgestellt werden, um das Auftreten beziehungsweise das

Fortschreiten des schweren Krankheitsbildes zu verhindern. Selbst Kinder, die schon das volle Krankheitsbild unbehandelter Galaktosämie entwickelt haben, zeigen nach Galaktoseentzug einen eindrucksvollen Rückgang der Symptome. Ob die Diät strikt eingehalten wird, kann gut durch die Messung von Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten kontrolliert werden.

Somit ist die Früherkennung dieser Stoffwechselkrankheit, deren Genfrequenz, untersucht bei drei Millionen Neugeborenen in den U S A und Europa, bei 1 : 58 000 liegt, für den Kinderarzt, aber auch für jeden in freier Praxis tätigen Arzt eine dringende Forderung.

Außer der Möglichkeit, bei Neugeborenen generell Screening-Tests durchzuführen, kann durch die Untersuchung von Amnionzellkulturen schon pränatal zu einem Zeitpunkt, an dem noch ein legaler Schwangerschaftsabbruch möglich ist, eine exakte Diagnose gestellt werden (7, 46). Dies gilt zum Beispiel für Eltern, die homozygote oder heterozygote Defektträger der klassischen Galaktosämie sind. Auch wenn keine Interruptio erwogen wird, ist es sinnvoll, zu einem frühen Zeitpunkt zu testen, da die homozygote Frucht durch eine galaktosefreie Diät der Mutter möglicherweise schon während der Schwangerschaft vor toxischen Metaboliten geschützt werden kann. Sitzelmann und Kaloud diskutierten in einer 1975 veröffentlichten Übersichtsarbeit, daß schon bei geringfügig erhöhten Galaktosewerten im Blut Schwangerer das Gehirn des Fötus geschädigt werden könnte (42).

Daß eine verantwortungsbewußte genetische Beratung für die Eltern durchgeführt werden muß, ist selbstverständlich.

Bezüglich des Verhaltens von Fibroblasten und Amnionzellen während einer längeren Wachstumsperiode sind in der Literatur, insbesondere was Amnionzellen betrifft, wenig Angaben gemacht. Tedesco und Mellman (43) stellten keinen Anstieg der Enzymaktivität während des Wachstums von Fibroblastenkulturen fest, während Russel (34) ein logarithmisches Ansteigen so-

wohl der Gesamtaktivität als auch des Gesamtproteins und eine lineare Zunahme der spezifischen Aktivität bis zum achten Tag beschrieb. Die Angaben über kinetische Daten wie Michaelis-Konstanten und pH-Optima sind ebenfalls unterschiedlich.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll deswegen angesichts dieser unterschiedlichen Aussagen anhand von Proben gesunder Genträger das Wachstumsverhalten von Fibroblasten und Amnionzellen und die Stoffwechselkinetik der Uridyltransferase untersucht werden.

Einige ältere Methoden im Neugeborenen-Screening zur Erfassung des Uridyltransferase-Mangels basierten auf der Tatsache, daß nach Inkubation mit (1-14C)-Galaktose sehr wenig oder keine 14-CO_2-Abgabe bei Fibroblasten, Leukozyten oder Gesamtblut von Galaktosämikern nachzuweisen war (21, 20). Allerdings war dabei die Inkubationszeit mit 90 Minuten kurz und die Verwendung von hohen Glucosekonzentrationen mag die Galaktoseverwertung beeinträchtigt haben (29).

Andere Autoren berichteten jedoch, daß (1-14C)-Galaktose in vivo von Patienten mit Uridyltransferasemangel in markiertes Kohlendioxyd umgewandelt und daß diese Fähigkeit in erheblichem Maße durch Progesteron stimuliert wurde (28, 36, 37). Desgleichen wurde die Fähigkeit von Fibroblasten, Galaktose zu 14-CO_2 zu verwerten, beschrieben (29, 8).

Diese Fakten werden ergänzt durch Berichte über geringe Uridyltransferaseaktivitäten in Fibroblasten, die von Galaktosämikern stammten (32, 34).

In ihrer Gesamtheit unterstützen diese Fakten die Existenz eines alternativen Stoffwechselweges, wie er oben beschrieben ist.

Ein Teil der Untersuchungen über den Einfluß von Galaktose auf das Wachstumsverhalten von Galaktosämie-Fibroblasten ergab einen deutlichen Hemmeffekt gegenüber dem glucosehaltigen Nähr-

medium (21, 20, 6) und es konnten Veränderungen der Zellstruktur nachgewiesen werden (24). Tedesco und Mellman jedoch stellten keine Hemmung des Wachstums von Galaktosämie-Fibroblasten durch Galaktose fest. Allerdings fügten sie dem Nährmedium zusätzlich Glucose bei (43).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind Ausgangspunkt des zweiten Teils meiner Arbeit, in dem der Einfluß von Glucose und Galaktose als Nährsubstrat auf die Enzymaktivität untersucht wird.

METHODEN

1. Zellkultivierung

Haut wird von der Innenseite des Unterarms gewonnen, indem eine Procain-Quaddel gesetzt und ein 0,3 bis 0,5 cm^3 großes Gewebestück entnommen wird. Die Probe wird zerkleinert. Die Amnionzellen stammen von Amniocentesen, die um die 17. Schwangerschaftswoche durchgeführt werden.

Dieses Gewebe bzw. Zellmaterial wird dann in einer Gewebekulturflasche mit perforierter Folie unter Zugabe von 10 ml des folgenden Mediums angesetzt:

TC-Medium HAM F 10 (DIFCO)	75 %
Hexosefreies Kälberserum (GIBCO)	20 %
$NaHCO_3$	14 mM
Antibiotika, Antimykotika	0,75%
Penicillin 10 000 U/ml Fungizone 25 mcg/ml Streptomycin 10 000 mcg/ml	
Glucose (bzw. Galaktose)	100 mg%

Nach durchschnittlich elf Tagen Wachstum werden dann Tochterflaschen mit Zellen der Mutterkulturen beschickt. Die Zellen werden mit 0,25%igem Bacto-Trypsin abgedaut, das Sediment nach acht Tagen wieder trypsinisiert und je 3000 - 4000 Zellen in Falcon 3024 Gewebekulturflaschen eingebracht. Das Nährmedium dieser Zellkulturen wird alle 3 - 4 Tage gewechselt.

2. Aufbereitung der Fibroblasten- und Amnionzellkulturen

Das überstehende Medium in den Gewebekulturflaschen wird abgesaugt. Sodann wird mit ca. 3 ml physiologischer Kochsalzlösung der Zellbelag gespült und wieder abgesaugt, um totes Zellenmaterial zu entfernen. Die toten Zellen würden sonst in die Proteinbestimmung miteinbezogen und so falsche Enzymaktivitätswerte verursachen. Nun wird in zwei Arbeitsgängen mit je 3 ml 0,9%iger Kochsalzlösung die Zellschicht vom Flaschenboden durch "scrapen" entfernt. Dies geschieht durch Schaben mit einem kunststoffüberzogenen Draht. Die so gewonnene Zellaufschwemmung wird in ein Reagenzglas pipettiert und mit einem Rotationsmischer geschüttelt, um zusammenhängende Zellverbände zu lösen. Dann wird zweimal fünfzehn Minuten bei 200xg zentrifugiert, wobei nach dem ersten Durchlauf der Überstand abgesaugt, nochmals mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und geschüttelt wird. Nach dem zweiten Durchlauf wird der Überstand wieder abgesaugt, zu den Zellen nun aber 10 mM Mercaptoäthanol gegeben. Diese Zellsuspension wird in ein Eppendorfgefäß pipettiert, wobei der nach kurzem Einfrieren und Auftauen und nochmaligem Zentrifugieren (200xg, 10 min) gewonnene Überstand nun für den Testansatz und die Proteinbestimmung bereitsteht.

3. Leukozytenpräparation

Lösungen:

a) Leukolösung: 5 g Dextran
0,7 g NaCl
50 mg Heparin
in 100 ml Aqua dest.

b) NaCl-Lösung 0,7%

c) Essigsäure 0,1%

Methode:
Es werden 10 ml heparinisiertes Venenblut in ein Reagenzglas mit 2 ml Leukolösung eingebracht und vorsichtig durch Kippen gemischt. Dann läßt man eine Stunde bei Raumtemperatur sedimentieren. Der Überstand wird abgehoben, wobei darauf zu achten ist, daß keine Erythrozyten mitgenommen werden, und dann 15 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Leukozytensediment, welches noch Erythrozyten enthält, wird mit 0,3 ml 0,1%iger Essigsäure 15 - 30 sec geschüttelt, mit 0,7%iger NaCl-Lösung aufgefüllt und nochmals 15 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Nun wird das Sediment in 1,5 ml Aqua dest. suspendiert und steht für den Testansatz bereit.

4. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wird die Methode nach Lowry angewendet (22), die in unserem Labor modifiziert wurde.

Es werden zwei Lösungen frisch angesetzt:

Lösung I: 0,2 ml a + 0,02 ml b

a = 1,35 g Na-K-Tartrat in 100 ml Aqua dest.
b = 5,5 g Kupfersulfat in 100 ml Aqua dest.

Lösung II: 5 ml Lösung c + Lösung I

c = 2% Natriumcarbonat (wasserfrei) in n/10 NaOH

Außerdem werden Folin - Ciocalteus Phenolreagenz (mit 2% Natriumcarbonat im Verhältnis 1 : 1 verdünnt) und Rinderserumalbumin-Standardlösungen verwendet, die auf folgende Konzentrationen gebracht werden:
0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 mg / ml.

Arbeitsgang:
Vom zentrifugierten Überstand der Zellsuspension werden 20 mikroliter mit 200 mikroliter Lösung II versetzt und zehn

Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann werden 20 mikroliter Folin - Ciocalteus - Phenolreagenz zugegeben und dieser Ansatz 30 bis 35 Minuten unter Lichtabschluß belassen. Danach werden 200 mikroliter in eine Mikroküvette gegeben und unter Verwendung des Mikroschlitzes (1 mal 4) am Eppendorf - Photometer bei 722 nm mit rotempfindlichem Multiplyer gegen den Leerwert abgelesen.

5. Enzymbestimmung

Der im folgenden beschriebene Enzym - Test basiert auf der C-14-Methode, wie sie von Bertoli und Segal (1) und Tedesco und Mellman (43) erstmals beschrieben und in unserem Labor abgewandelt wurde (40, 41).

Verwendete Lösungen:

1.	Galaktose-1-Phosphat	25 mM
2.	UDP-Glucose	4 mM
3.	Glycin-NaOH	1 M; pH 8,2
4.	Cystein-HCl	0,2 M; pH 8,2
5.	14-C-Galaktose-1-Phosphat	10 mikro-Curie/ml

Das stark saure Cystein-HCl wird erst kurz vor Versuchsbeginn auf pH 8,2 gebracht. Aus zwei Teilen Lösung 5 und ein Teil Lösung 1 wird ein "Mix" aus markiertem und unmarkiertem Galaktose-1-Phosphat hergestellt. Als Reaktionsgemisch resultiert nun:

	Konzentration im Reaktionsgemisch
1 Teil "Mix"	1,665 mikro-Curie/ml 14-C-Galaktose-1-Phosphat + 2,08 mM Gal-1-P
1 Teil Lösung 2	1 mM UDP-Glucose
1 Teil Lösung 3	0,25 M Glycin-NaOH
1 Teil Lösung 4	0,05 M Cystein-HCl

Die Endkonzentrationen im Testansatz betragen die Hälfte derer im Reaktionsgemisch, da die gleiche Menge Überstand hinzugefügt wird.

Testansatz: 100 mikroliter Überstand der Zellsuspension
100 mikroliter Reaktionsgemisch

Der Testansatz inkubiert eine Stunde bei 37° C. Danach wird durch einen 3-minütlichen Kochstop bei 95° C die Enzymreaktion beendet. Für den Leerwert wird anstelle von Zellenmaterial die entsprechende Menge Aqua destillata verwendet.

6. Vorbereitung der DEAE-Zellulose

10 g trockene Diäthylaminoäthyl - Zellulose werden in vier Liter Aqua destillata suspendiert und die langsamer sinkenden feinen Partikel abgesaugt, nachdem die Zellulose sich gesetzt hat. Das Sediment wird dreimal mit Aqua dest. gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Dann wird eine dem anfänglichen Wasservolumen entsprechende Menge 1 N NaOH zugefügt und unter wiederholtem Umrühren 1 Stunde stehengelassen. Nun erfolgt erneutes Waschen mit Aqua dest., bis ein pH von 7 erreicht ist. Man läßt dann auf die Suspension 0,1 N HCl unter wiederholtem Umrühren 1 Stunde lang einwirken. Nach dem Sedimentieren wird mit Aqua dest. gewaschen, bis ein pH von 3 bis 4 erreicht ist. In dieser Form kann die Zellulose aufbewahrt werden.

Unmittelbar vor dem Säulentrennungsverfahren wird der wäßrige Überstand abgesaugt, das Sediment mit 20 mM HCl aufgefüllt und umgerührt. Diese DEAE - Zellulose kann nun für den Trennungsgang benützt werden.

7. Säulenchromatographie

Seit 1966 sind mehrere Veröffentlichungen erschienen, die für die Trennung des Substrates Galaktose-1-Phosphat vom Reaktionsprodukt UDP-Galaktose die Verwendung von DEAE-Zellulose-Papier beschreiben (1, 7, 14, 25, 33, 38, 43). In unserem Labor wird eine hier entwickelte, säulenchromatographische Methode benützt, die im folgenden beschrieben ist. Sie ist bezüglich der Veröffentlichung (40) nur unwesentlich abgewandelt. Erwähnt seien die Vorteile wie: Geringerer Zeitaufwand gegenüber der Papierchromatographie; es können ohne großen Aufwand 50 - 100 Proben zu gleicher Zeit verarbeitet werden; gut übereinstimmende Doppelwerte; niedrige Leerwerte.

Für die Trennung des während der Inkubationszeit entstandenen Reaktionsproduktes UDP-Galaktose vom Substrat Galaktose-1-Phosphat werden mit DEAE - Zellulose beschickte 2 ml Einmalspritzen benützt. Dazu wird der Stempel entfernt und die innere Kanülenöffnung mit einer etwa 3 mm dicken Schicht aus Glaswolle bedeckt. Die so präparierten Spritzen werden in ein Gestell gehängt, wobei die Kanülenöffnung in ein 20 ml-Szintillationsgefäß hineinreicht. Dann wird die Zellulose - Suspension mit einer Pasteur - Pipette auf die Glaswolle gebracht und zwar so, daß nach dem Abtropfen der Flüssigkeit die Säule bis zur 0,8 ml - Marke gefüllt ist.

Von der Probe werden dann 150 mikroliter auf die Säule pipettiert, drei Fraktionen 20 mM HCl zu je 2 ml auf die Säule gegeben und die aufgefangene Flüssigkeit verworfen.
Die folgenden drei Fraktionen

1,5 ml 20 mM HCl
1,5 ml 100 mM HCl
1,5 ml 100 mM HCl

werden gesammelt und im Counter gezählt. Dazu werden die Gefäße mit Szintillationsflüssigkeit gefüllt und kräftig geschüttelt, bis die Lösung klar ist und eine stabile Emulsion

entstanden ist. Für den 100 % - Wert, das Maß für die absolut eingesetzte Menge Radioaktivität, werden 150 mikroliter Probenvolumen direkt in das Szintillationsgefäß eingebracht, 1,35 ml 100 mM HCl und 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und im Counter gezählt.

Trennungsprinzip:
Mit 20 mM HCl wird aus den Säulen das Galaktose-1-Phosphat und mit der 100 mM HCl UDP-Galaktose eluiert. Hierbei wird der Vorteil verschiedener Dissoziations-Konstanten von Mono- und Di-Phosphat-Verbindungen in saurem Milieu ausgenützt (33). Galaktose-1-Phosphat erscheint ab einer HCl-Konzentration von 15 - 20 mM im Eluat, UDP-Galaktose bei etwa 50 mM. Mit dem Abstand der Konzentrationen von 20 zu 100 mM HCl kann auf diese Weise eine hinreichend exakte Trennung beider Substanzen erzielt werden.

MATERIAL

1. Zellkultivierung

Die Zellen (Amnionzellen mit den morphologischen Varianten AF, E, AF/E und Fibroblasten) stammen von Patienten der genetischen Beratungsstelle in der Schiller-Straße, 8000 München 2, und der Universitätsfrauenklinik 7900 Ulm, Sektion Cytogenetik, Bereich Oberer Eselsberg.

(An dieser Stelle möchte ich Frau Dr. Brigitte Haas und Frau Dr. Antje Wirtz für die hilfreiche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit danken.)

Falcon 3024 Tissue Culture Flask, 1950 Williams Drive, Oxnard, California

TC-Medium HAM F 10, getrocknet und BACTO-Trypsin von DIFCO Laboratories, Detroit

Fötales Kälberserum, Virus u. Mycoplasma screened, GIBCO Laboratories

Natriumbicarbonat von Merck, Darmstadt

Glucoselösung 100 mg%, Fresenius, Bad Homburg; Galaktoselösung 100 mg%, Krankenhausapotheke des Innenstadtklinikums der Universität München.

2. Zellaufbereitung

Mecaptoäthanol 10 mM von Schuchardt, München

Dextran von Serva Feinbiochemica, Heidelberg;
NaCl-Lösung 0,9 % von Fresenius, Bad Homburg;
Essigsäure 0,1 % von Merck, Darmstadt;
Heparin von Nordmarck.

3. Proteinbestimmung

Sämtliche Chemikalien von Merck, Darmstadt.

4. Enzym-Testansatz

14-C-Galaktose-1-Phosphat, Ammoniumsalz, wäßrige Lösung mit 2 % Äthanol, sterilisiert, 200 mCi/mmol von Amersham Buchler; Galaktose-1-Phosphat, UDP-Glucose von Boehringer, Mannheim; Glycin-NaOH, Cystein-Cl von Merck, Darmstadt.

5. Säulenchromatographie

Einmalspritzen 2 ml (Braun-Melsungen) mit Einlage aus Glaswolle; Servacel-DEAE-23 SS p.A., Standardkapazität 0,55 - 0,75 mäq/g, Körnung 50 - 200 mikrometer, Volumen (feucht) 7,5 g/ml von Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Liquid Scintillator KL 402, E. max. 415 nm von Koch-Light-Laboratories Ltd., Colnbrook Bucks, England.

ERGEBNISSE

1. Kinetische Daten

a) pH - Optima

Die Aktivität der Uridyltransferase wurde in einem pH - Bereich von 7,25 bis 9,5 gemessen mit der Abstufung: pH 7,25; 7,6; 8,0; 8,2; 8,4; 9,0; 9,5.

Dabei zeigte sich, daß die größte Enzymaktivität bei Werten zwischen pH 8,0 und pH 8,4 lag. Dies galt für alle untersuchten Zellarten (Abb. 1a).

b) Michaelis - Menten - Kinetik

Die Untersuchung der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit der Uridyltransferase erfolgte durch Variierung sowohl des Substrates Galaktose-1-Phosphat als auch des Cofaktors UDP-Glucose. Es wurden folgende Konzentrationen benützt: Galaktose-1-Phosphat 0,104; 0,208; 0,347; 0,521; 1,042; 2,083, 4,166 mM bei konstant 0,5 mM UDP-Glucose.

Die Konzentrationen für UDP-Glucose betrugen: 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1,5 mM bei konstant 1,04 mM Galaktose-1-Phosphat.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den verschiedenen Konzentrationen ist in Abb. 2 am Lineweaver-Burk-Diagramm aufgezeigt.

Die Michaelis - Konstanten für Galaktose-1-Phosphat betrugen 1 mM für das Enzym in Amnionzellen und Fibroblasten und 0,9 mM für die Transferase in Leukozyten.

Für die UDP-Glucose ergaben sich Werte von 0,09 mM in Amnionzellen, 0,083 mM in Fibroblasten und 0,102 mM in Leukozyten.

2. Enzymaktivitäten und Proteinwerte während der Zellkultur

Es wurden zwischen dem zweiten und zwanzigsten Tag der Zellkultur alle zwei bis drei Tage Doppelbestimmungen der Enzymaktivität aus je zwei Kulturflaschen durchgeführt. Zudem wurden jeweils die Proteinwerte gemessen.

Die Ergebnisse für Amnionzellen und Fibroblasten sind in Abb. 3a und 3b dargestellt. Es ergab sich eine logarithmische Zunahme der Proteinwerte, ausgedrückt in mikrogramm pro Flasche und der Enzymaktivität, ausgedrückt in 14-C-counts pro Minute.

Die Werte für die spezifische Aktivität, ausgedrückt in nmoles / min / mg Protein, stiegen linear an und erreichten zwischen dem 10. und 15. Tag ihr Maximum. Danach sanken die Werte bis zum 20. Tag wieder auf das Anfangsniveau. Bei Amnionzellen ist eine Plateau - Phase zwischen dem 10. und 15. Tag der Zellkuktur festzustellen (Abb. 4a und 4b).

3. Enzymaktivitäten und Proteinwerte unter dem Einfluß von Glucose und Galaktose

Für die Untersuchungen mit Mediumwechsel unterlagen die Zellkulturen unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Dazu wurde das Medium am 4. Tag erneuert und Enzym- und Proteinwerte am 4. und 8. Tag bestimmt. Es wurde entweder nur mit Galaktose bzw. Glucose kultiviert oder es wurde am 4. Tag die Hexose gewechselt und zwar von Glucose auf Galaktose und umgekehrt. Dabei kamen jeweils Hexosekonzentrationen von 100 mg / 100 ml Medium zur Anwendung.

Schließlich wurde noch der Einfluß von 200 mg% Galaktose und eines Gemisches von 90 mg% Galaktose und 10 mg% Glucose auf das Enzymverhalten untersucht.

Es war ein deutlich besseres Zellwachstum in glucosehaltigem Nährmedium im Vergleich zum Nährsubstrat mit Galaktose bei heterozygoten Galaktosämikern und gesunden Probanden festzustellen (Abb. 5). Es muß allerdings eingeschränkt werden, daß der Wert für das Zellprotein bei dem heterozygoten Probanden in Abb. 5a am 4.Tag für Galaktose höher als für Glucose ist.

Die gesunden Zellen zeigten nach dem 4. Tag eine insgesamt fallende Tendenz im Proteingehalt, während die heterozygoten darin anstiegen, mit Ausnahme beim Wechsel von Glucose auf Galaktose in Abb. 5b. Allerdings lag das Niveau der Meßergebnisse des 4. Tages bei den heterozygoten Zellkulturen niedriger.

Die spezifische Enzymaktivität ist unter dem Einfluß von Galaktose bei gesunden und heterozygoten Genträgern vermindert (Abb. 6). Die Enzymaktivität ist am 4. Tag nach Zellwachstum in Glucose höher als unter Galaktoseeinfluß. Besonders augenfällig ist der Unterschied beim gesunden Probanden, bei dem der 4-Tage-Wert für Glucose fast das Vierfache des Galaktose-Wertes erreicht, während sich bei den heterozygoten Probanden die Werte für die Enzymaktivität unter Glucoseeinfluß auf das Doppelte derer für Galaktose erhöhen.

Hiermit stehen auch die 4-Tage-Werte für das Zellprotein beim gesunden Probanden in Einklang.

Nach dem vierten Tag steigt bei einem der heterozygoten Probanden (Abb. 6a) mit beiden Hexosen die Enzymaktivität an, allerdings weniger stark für Galaktose. Der andere heterozygote und der gesunde Proband (Abb. 6b und 6c) zeigen mit Galaktose ein Absinken und mit Glucose einen Anstieg der Enzymaktivität.

Messungen der Uridyltransferaseaktivität bei Patienten mit Galaktokinasemangel ergaben keine eindeutigen Resultate. Ein Hemmeffekt von Galaktose auf das Enzymverhalten der Uridyltransferase konnte hier nicht nachgewiesen werden. Zellen

zweier Probanden, von denen der eine homozygot und der andere heterozygot bezüglich des Galaktokinasemangels erkrankt war, zeigten mit Galaktose nach dem vierten Tag der Zellkultur einen Anstieg der Enzymaktivität, der größer war als mit Glucose. Bei einem weiteren homozygot Erkrankten ergab sich der fördernde Einfluß von Galaktose nur für das Zellwachstum, während sich das Enzymverhalten wie beim Uridyltransferasemangel entwickelte, das heißt, mit deutlich erhöhten Enzymaktivitätswerten unter Glucoseeinfluß.

Im Verlauf des Wachstums einer bezüglich der Galaktosämie heterozygoten Zellkultur in einem Medium mit 90 mg% Galaktose und 10 mg% Glucose war vom 4. bis zum 8. Tag ein Anstieg und danach bis zum 11. Tag ein starker Abfall der spezifischen Enzymaktivität festzustellen (Abb. 7a).

Dagegen zeigten heterozygote Galaktosämiezellen in einem Medium mit 200 mg% Galaktose auch nach dem 8. Tag einen deutlichen Anstieg der spezifischen Enzymaktivität (Abb. 7b).

DISKUSSION

Wie ich in der Einleitung dieser Arbeit schon dargestellt habe, sind die Ergebnisse der Arbeiten, die sich mit meinem Thema beschäftigen, teilweise widersprüchlich. Außerdem ist festzustellen, daß die Uridyltransferase, insbesondere im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Früherkennung der Galaktosämie, noch wenig untersucht ist.

Der in meinen Versuchen ermittelte pH-Bereich von pH 8,0 bis pH 8,4, in dem die Enzymaktivität Maximalwerte erreichte, stimmt mit den Werten der Mehrzahl der Untersucher überein. Einige geben das pH - Optimum etwas höher an, wie Shirley Rogers et al. für Darmmucosa mit 8,6 (31) und Tedesco et al. mit 8,5 für Leukozyten und Fibroblasten (43).

Entsprechend unseren Ergebnissen wählten wir für den Enzymassay ein Puffergemisch mit einem pH-Wert von 8,2. Die Uridyltransferase zeigte in den drei untersuchten Zellarten (Amnionzellen, Fibroblasten und Leukozyten) ähnliche kinetische Eigenschaften. Streng genommen, können meine Werte für die Michaelis - Menten - Kinetik der Uridyltransferase nur mit den Ergebnissen derjenigen Autoren verglichen werden, die für den konstant gehaltenen Reaktionspartner etwa gleiche Konzentrationen wählten und die ihre Untersuchungen an Zellen und Geweben anstellten, wie ich sie verwendete. Diese Voraussetzung trifft nur für die Untersuchungen von Tedesco und Mellman zu (44). Sie fanden mit unseren Ergebnissen übereinstimmende Werte der Michaelis - Konstante sowohl für UDP-Glucose als auch für Galactose-1-Phosphat bei weitgehender Übereinstimmung der konstant gehaltenen Reaktionspartner mit den von uns gewählten Konzentrationen. Als Testmaterial dienten ihnen Fibroblasten und Leukozyten (siehe Tabelle).

Wenn ich meine Ergebnisse trotzdem mit allen mir verfügbaren Arbeiten vergleiche, dann ergibt sich vorbehaltlich oben an-

geführter Einschränkungen und der Tatsache, daß manche Autoren die Konzentration für den konstant gehaltenen Reaktionspartner nicht angeben, daß sich meine Werte für die Michaelis-Konstante der UDP-Glucose gut in die Skala der Werte anderer Autoren einordnen lassen. Es sind mit geringen Ausnahmen keine großen Abweicheungen von 0,1 mM festzustellen.

Anders ist es für Galaktose-1-Phosphat, wo die Konzentrationsangaben in sieben von acht Fällen beträchtlich unter meinen Werten liegen.

Autor	Anderes Testmat.	pH-Optimum Fib/Amn/ Leu	K_m-Wert für UDP-Glu (mM) Fib/Amn/ Leu	K_m-Wert für Gal-1-P (mM) Fib/Amn/ Leu
Eigene Werte		8,0-8,4	0,083/ 0,09/ 0,102	1,0/1,0/ 0,9
Tedesco u. Mellman (44)		8,5	0,123/-/ 0,137	1,0/-/ 1,25
Koo, Rogers, Segal (47)	Rattendarm-mucosa		0,12	0,46
Rogers, Holtzapple, Mellman, S. (31)	Darm-Mucosa	8,6	0,03	0,08
Saito, Ozutsumi, Kurahashi (48)	E.coli	8,5		
Inouye, Nadler, Hsia (14)	rote und weiße Blutzellen		1,6	3,2
Segal, Rogers, Holtzapple (38)	menschl. Leber	8,25	0,14	0,10
Bertoli, Segal (1)	Rattenleber	8,3-8,6	0,16	0,14
Wong, Frey (49)	E.coli		0,20	0,30
Tedesco, Mellman (43)		8,5		
Pesce et al. (50)	Erythrozyten		0,16	0,45
Beutler, Baluda (3)	Erythrozyten		0,16	0,39

Einige Autoren berichteten, daß die Michaelis-Menten-Konstanten für Galaktose-1-Phosphat und UDP-Glucose in der Darmschleimhaut (31) und in Erythrozyten (3) ansteigen, wenn der konstant gehaltene Reaktionspartner in höheren Konzentrationen eingesetzt wurde.

Wir beobachteten, daß Substratkonzentrationen nahe dem Bereich ihrer Michaelis-Konstanten bereits eine leichte Enzymhemmung verursachten. Deshalb verwendeten wir niedrigere Substratkonzentrationen, als sie in den üblichen Enzym-Test-Beschreibungen angegeben sind.

Der Verlauf der Enzymaktivitätswerte und der Proteinwerte während der Zellkultur zeigt, daß im Verhalten von Amnionzellen und Fibroblasten nur graduelle Unterschiede auftreten. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß in der pränatalen Diagnose Erkenntnisse aus der Untersuchung von Fibroblasten übernommen werden können, zumal die Daten für Amnionzellen noch sehr spärlich sind.

Wir fanden die Beobachtung von Won G. Ng. (46) bestätigt, daß die Aktivität der Uridyltransferase in Fibroblasten höher lag als in Zellen der Amnionflüssigkeit (siehe Abb. 4a und 4b). Die Tatsache, daß die spezifische Aktivität der Uridyltransferase in Amnionzellen bis zum 10. Tag der Zellkultur ansteigt und dann ein Plateau erreicht, welches sie bis zum 15. Tag der Zellkultur beibehält, macht die Aktivitätsmessung während der Plateauphase zwingend notwendig, da Messungen vor und nach diesem Zeitpunkt weniger gut reproduzierbare Daten liefern würden. Dies setzt aber zum einen voraus, daß sich der von uns beobachtete Kurvenverlauf als kennzeichnend für Amnionzellkulturen erweist. Zum anderen muß geprüft werden, unter welchen qualitativen und zeitlichen Wachstumsbedingungen sich ein reproduzierbarer Kurvenverlauf ergibt. Das wird aber erst möglich sein, wenn eine größere Zahl von Untersuchungen an Amnionzellen durchgeführt sein wird.

Weitere Untersuchungen müssen auch zeigen, ob der Vorschlag von Tedesco und Mellman (43), bei der Testung von Fibroblasten das Verhältnis von Transferase- zur Galaktokinaseaktivität zu messen, auch für Zellen der Amnionflüssigkeit Anwendung finden könnte. Sie stellten fest, daß die Aktivitäten der Einzelenzyme größeren Schwankungen unterlagen, als der Quotient Transferase / Galaktokinase. Hier herrscht Übereinstimmung mit der Arbeit von Won G. Ng. (46), die ebenfalls von starken Schwankungen beider Enzyme in kultivierten Amnionzellen berichtet und in der das Anlegen von Kontrollkulturen dringend empfohlen wird.

In diesem Zusammenhang könnte unsere Beobachtung von Interesse sein, daß die spezifische Aktivität der Uridyltransferase in Zellen der Amnionflüssigkeit schneller ansteigt, als die der Galaktokinase, während bei Fibroblasten der umgekehrte Fall eintritt.

Im Einklang mit Berichten von Krooth und Darlington (19) und Chacko et al. (6) ist ein wachstumshemmender Effekt von Galaktose auf Zellkulturen festzustellen. Im Gegensatz zu Krooth und Weinberg, die von gleichem Wachstum gesunder und kranker Zellen in 100 mg% Galaktose-Medium berichteten (21), konnten wir auch einen deutlichen Hemmeffekt auf gesunde Fibroblasten registrieren.

Man muß jedoch berücksichtigen, daß Krooth und Weinberg die Zellen mit verringerten Glucosekonzentrationen auf den Wechsel in das Galaktosemedium "vorbereiteten".

Die Verminderung der spezifischen Enzymaktivität, die bei gesunden und heterozygoten Genträgern unter Galaktoseeinfluß zu beobachten war, läßt vermuten, daß entweder Galaktose selbst oder das vermehrt anfallende Galaktose-1-Phosphat das Enzym hemmen.

Daß ein Gemisch von 90 mg% Galaktose und 10 mg% Glucose nach dem 8. Tag der Zellkultur einen deutlichen Abfall der Enzymaktivität hervorrief, während diese in einem Medium mit 200 mg% Galaktose sogar noch weiter zunahm, stimmt überein mit dem Inhalt einer Veröffentlichung von Petricciani et al. (29).

Sie beobachteten, daß Glucose die Verwertung von 1-14C-Galaktose durch Fibroblasten von Galaktosämikern hemmte und folgerten hieraus, daß Glucose im Stoffwechsel des Galaktosämikers eine Schutzfunktion innehaben könnte. Gestützt wird diese Annahme auch durch die Beobachtung, daß solche Fibroblasten in einem Nährmedium mit 95 mg% Galaktose und 5 mg% Glucose annähernd normales Wachstum zeigen (21).

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde anhand von kultivierten Fibroblasten und Amnionzellen die Enzymkinetik der Uridyltransferase, das Verhalten der spezifischen Aktivität und des Zellproteins während einer mehrtägigen Zellkultur und der Einfluß von Galaktose auf Zellwachstum und Enzymaktivität bei heterozygoten und gesunden Fibroblasten untersucht. Die Daten der Enzymkinetik ergaben eine weitgehende Übereinstimmung für Fibroblasten und Amnionzellen.

Das pH-Optimum lag zwischen pH 8,0 und pH 8,4. Die Michaelis-Konstanten für Gal-1-Phosphat betrugen für Amnionzellen und Fibroblasten 1,0 mM, für Leukozyten 0,9 mM. Für UDP-Glucose erhielten wir Werte von 0,08 mM in Amnionzellen, 0,082 mM in Fibroblasten und 0,102 mM in Leukozyten.

Während der Zellkultur war ein logarithmischer Anstieg der Enzymaktivität (14-C-cpm) und des Zellproteins feststellbar.

Die spezifische Enzymaktivität (nmoles/Min/mg Protein) nahm ebenfalls zu, und zwar bis zum 10. - 15. Tag der Zellkultur.

Unter dem Einfluß von Galaktose ist eine deutliche Verminderung des Zellwachstums und der spezifischen Enzymaktivität bei bezüglich der Galaktosämie heterozygoten und gesunden Probanden feststellbar.

Im Verlauf des Wachstums heterozygoter Fibroblastenkulturen scheint eine geringe Glucosebeigabe zum Galaktosemedium im Vergleich zum reinen Galaktosemedium eine enzymhemmende Wirkung zu entfalten.

Zum Schluß möchte ich Frau Dr. Brigitte Haas und Frau Dr. Antje Wirtz vom Genetischen Labor der Kinder-Poliklinik (Leiter: Prof.Dr.Jan-Dieter Murken) herzlich danken. Ohne ihre hilfreiche Unterstützung wären meine Untersuchungen nicht möglich gewesen.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Bertoli, D. and Segal, S.:
J.Biol.Chem., 241: 4023 (1966)

(2) Beutler, E., Baluda, M.C., Sturgeon, P., Day, R.W.:
Lancet 353 (1965)

(3) Beutler, E. and Baluda, M.C.:
J.Lab.Clin.Med. 67: 427 (1966)

(4) Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini, C.E. and Paladini, A.C.:
J.Biol.Chem. 184: 333 (1950)

(5) Chacko, C.M., Mc Crone, L. and Nadler, H.L.:
Biochim.Biophys.Acta 268: 113 (1972)

(6) Chacko, C.M., Mc Crone , L. and Nadler, H.L.:
Biochim.Biophys.Acta 284: 552 (1972)

(7) Fensom, A.H., Bensom, P.F. and Blunt, S.:
Br.Med.J. 4: 386 (1974)

(8) Friedman, Th.B., Yarkin,R.J. and Merril, C.R.:
Cell.Physiol. 85: 569 (1974)

(9) Gitzelmann, R.:
Lancet 2: 670 (1965)

(10) Goeppert, F.:
Berlin.Klin.Wochenschr. 54: 473 (1917)

(11) Gorter, E.:
Arch.Dis.Childh. 26: 271 (1951)

(12) Gitzelmann, R., Hansen, R.G. and Steinmann, B.:
Eds.: F.A. Hommes and C.J. Van den Berg,
Academic Press, London 1975

(13) Holzel, A. and Komrower, G.M.:
Arch.Dis.Child. 30: 155 (1955)

(14) Inouye, T., Nadler, H.L. and Hsia, D.Y.:
Clin.Chim.Acta 19: 169 (1968)

(15) Isselbacher, K.J.:
J.Biol.Chem. 232: 429 (1958)

(16) Kalckar, H.M., Anderson, K.J. and Isselbacher, K.J.
Biochem.Biophys.Acta 20: 262 (1956)

(17) Kalckar, H.M., Braganca, B. and Munch-Petersen, A.:
Nature 172: 1038 (1953)

(18) Kosterlitz, H.W.:
Biochem.J. 37: 322 (1943)

(19) Krooth, R.S. and Darlington, G.A.:
In: Hsia, D.Y. Galactosemia, C.C. Thomas, 188 (1969)

(20) Krooth, R.S. and Weinberg, A.N.:
Biochem.Biophys.Res.Comm. 3: 518 (1960)

(21) Krooth, R.S. and Weinberg, A.N.:
J.Exp.Med. 113: 1155 (1961)

(22) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randwall, R.J.:
J.Biolog.Chem. 193: 265 (1951)

(23) Mathai, C.K., Beutler, E.:
Science 154: 1179 (1966)

(24) Miller, L.R., Gordon, G.B. and Bensch, K.G.:
Lab.Invest.19: 428 (1968)

(25) Musick, W.D.L. and Wells, W.W.:
Arch.Biochem.Biophys. 165: 217 (1974)

(26) Ng. W.G., Bergren, W.R., Donnel, G.N.:
Ann.hum.Genet. 37: 1 (1973)

(27) Pau, H.R., Kuhlmann, R., Schröter, J.:
Albrecht v. Graefe's Arch.Ophthal. 186: 165 (1973)

(28) Pesch, L.A., Segal, S., Topper, Y.J.:
J.Clin.Invest. 39: 178 (1960)

(29) Petricciani, J.C., Binder, M.K., Merril, C.R. and Geier, M.R.:
Science 175: 1368 (1972)

(30) von Reuss, A.:
Wien.Med.Wochenschr. 54: 799 (1908)

(31) Rogers, S., Holtzapple, P.G., Mellman, W.J. and Segal, S.:
Metabolism Vol. 19, No. 9: 701 (1970)

(32) Russel, J.D. and DeMars, R.:
Biochem.Genetic. 1: 11024 (1967)

(33) Russel, J.D.:
Biochem.Genet. 1: 301 (1968)

(34) Russel, J.D.:
In Hsia, D.Y.: Galactosemia, C.C. Thomas: 204 (1969)

(35) Schaub, J., Remberger, K., Endres, W. and Bremer, H.J.:
Helv.Paediat.Acta 31: 67 (1976)

(36) Segal, S., Blair, A., Topper, Y.J.:
Science 136: 150 (1962)

(37) Segal, S., Cuatrecasas, P.:
Amer.J.Med. 44: 340 (1968)

(38) Segal, S., Rogers, S. and Holtzapple, P.G.:
J.Clin.Invest. 50: 500 (1971)

(39) Segal, S.:
In: Stanburry, J.B., Wyngarden, J.B., Frederickson, D.S.: The metabolic basis of inherited disease, S. 174, 3.Aufl., New York, Mcgraw-Hill (1972)

(40) Shin-Bühring, Y.S., Osang, M., Ziegler, R. and Schaub, J.:
Clin.Chim.Acta 70: 371 (1976)

(41) Shin-Bühring, Y.S., Baier, T., Tan, A., Osang, M. and Schaub, J.:
Pediat.Res. 11: 1003 (1977)

(42) Sitzmann, F.C., Kaloud, H.:
Med.Klin. 70: 491 (1975)

(43) Tedesco, T.A. and Mellman, W.J.:
J.Clin.Invest. 48. 2390 (1969)

(44) Tedesco, T.A. and Mellman, W.J.:
In: Hsia, D.Y. Galactosemia. C.C. Thomas, S. 66 (1969)

(45) Walker, F.R., Hsia, D.Y., Slatis, H.M. and Steinberg, A.G.:
Ann.Hum.Genetic. 25: 287 (1962)

(46) Won G.Ng., Donnel, W.R., Bergren, W.R., Alfi, O. and Golbus, M.S.:
Clin.Chim.Acta 74: 227 (1977)

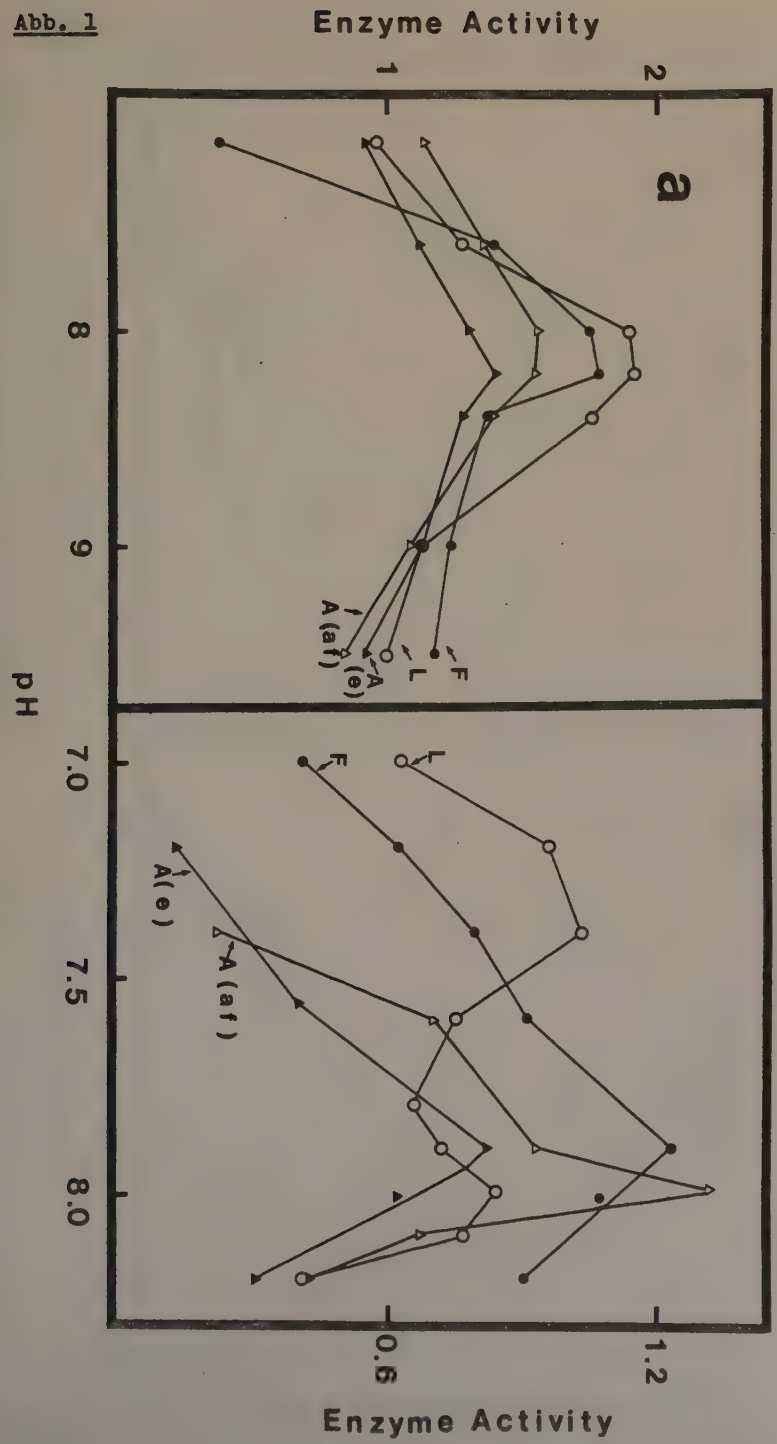
(47) Koo, C., Rogers, S. and Segal, S.:
Biol.Neonate 27: 153 (1975)

(48) Saito, S., Ozutsumi, M. and Kurahashi, K.:
J.Biol.Chem. 242: 2362 (1967)

(49) Lee-Yun Wong and Perry A. Frey:
Biochem.Vol. 13, No. 19, 3889 (1974)

(50) Pesce, M.A., Bodourian, S.H., Harris, R.C. and Nicholson, J.F.:
Clin.Chem. 23, 1711 (1977)

Abb. 1



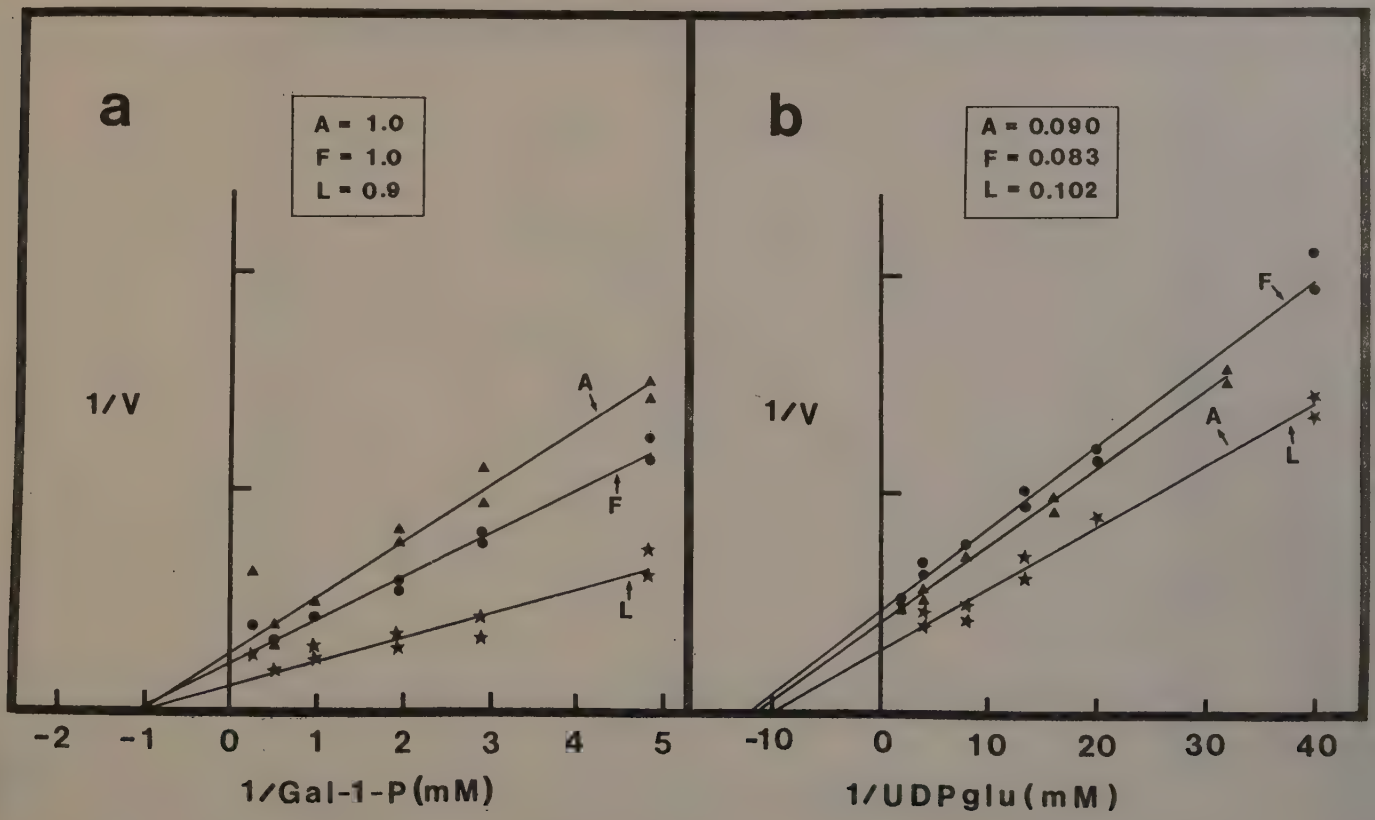

a
A = 1.0
F = 1.0
L = 0.9
1/V
A
F
L
-2
-1
0
1
2
3
4
5
1/Gal-1-P(mM)
b
A = 0.090
F = 0.083
L = 0.102
1/V
F
A
L
-10
0
10
20
30
40
1/UDPglu(mM)

Abb. 2

Abb. 3a

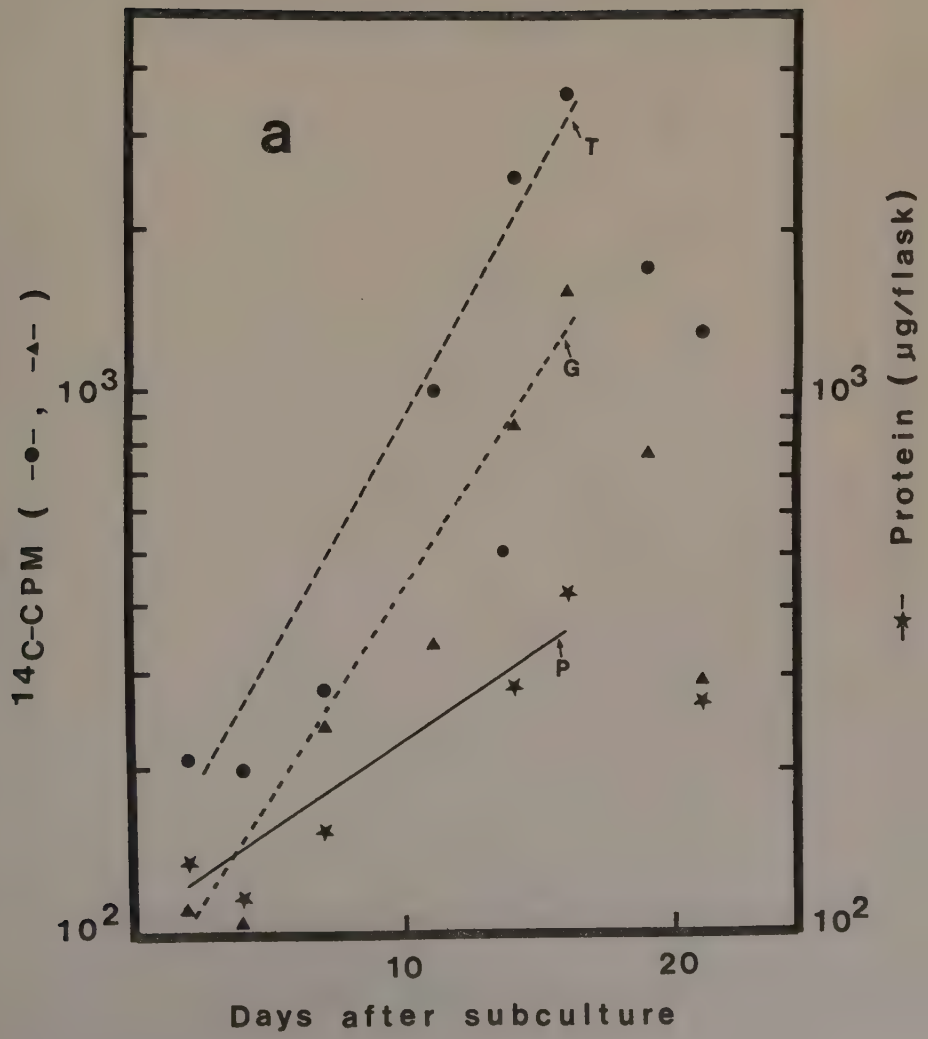
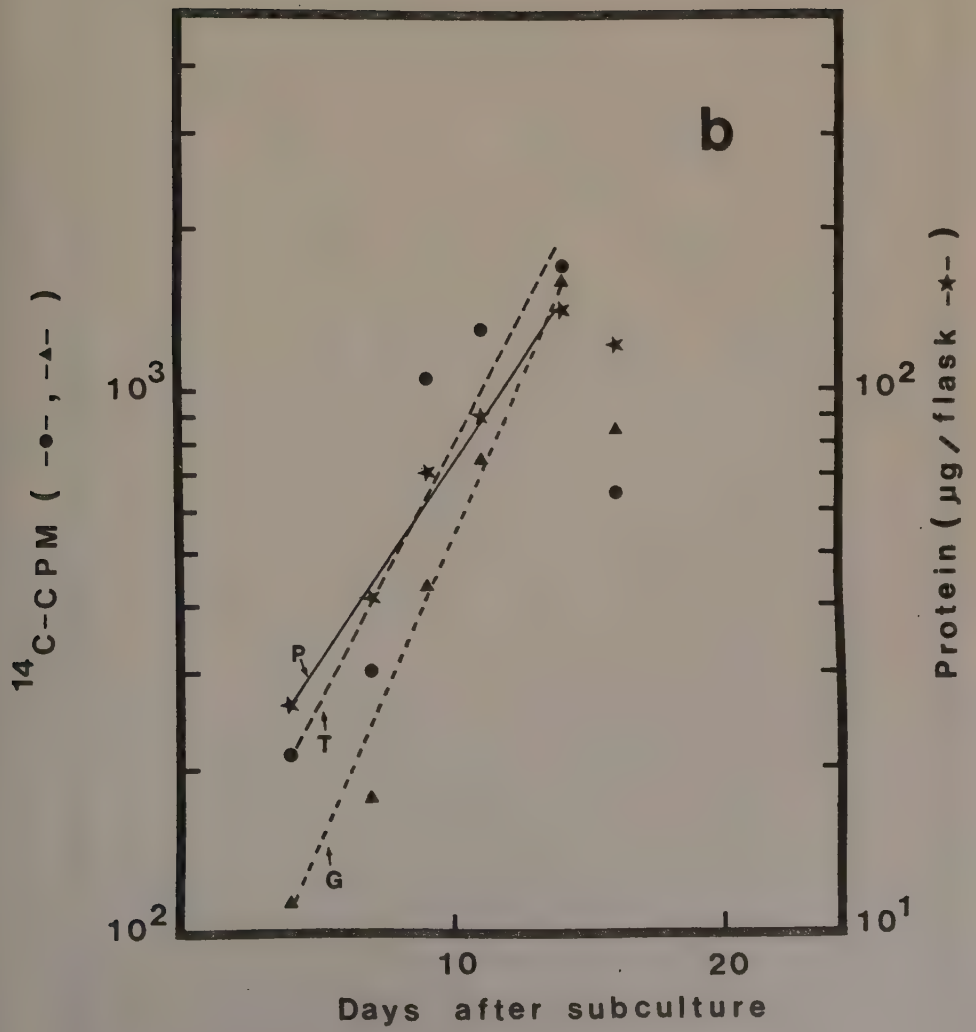

a
T
G
P
10^3
10^2
10^3
10^2
^{14}C-CPM (-●-, -▲-)
-★- Protein (µg/flask)
10
20
Days after subculture

Abb. 3b


b
10^3
10^2
10^2
10^1
10
20
Days after subculture
^{14}C-CPM (-●-, -▲-)
Protein (µg / flask -★-)
P
T
G

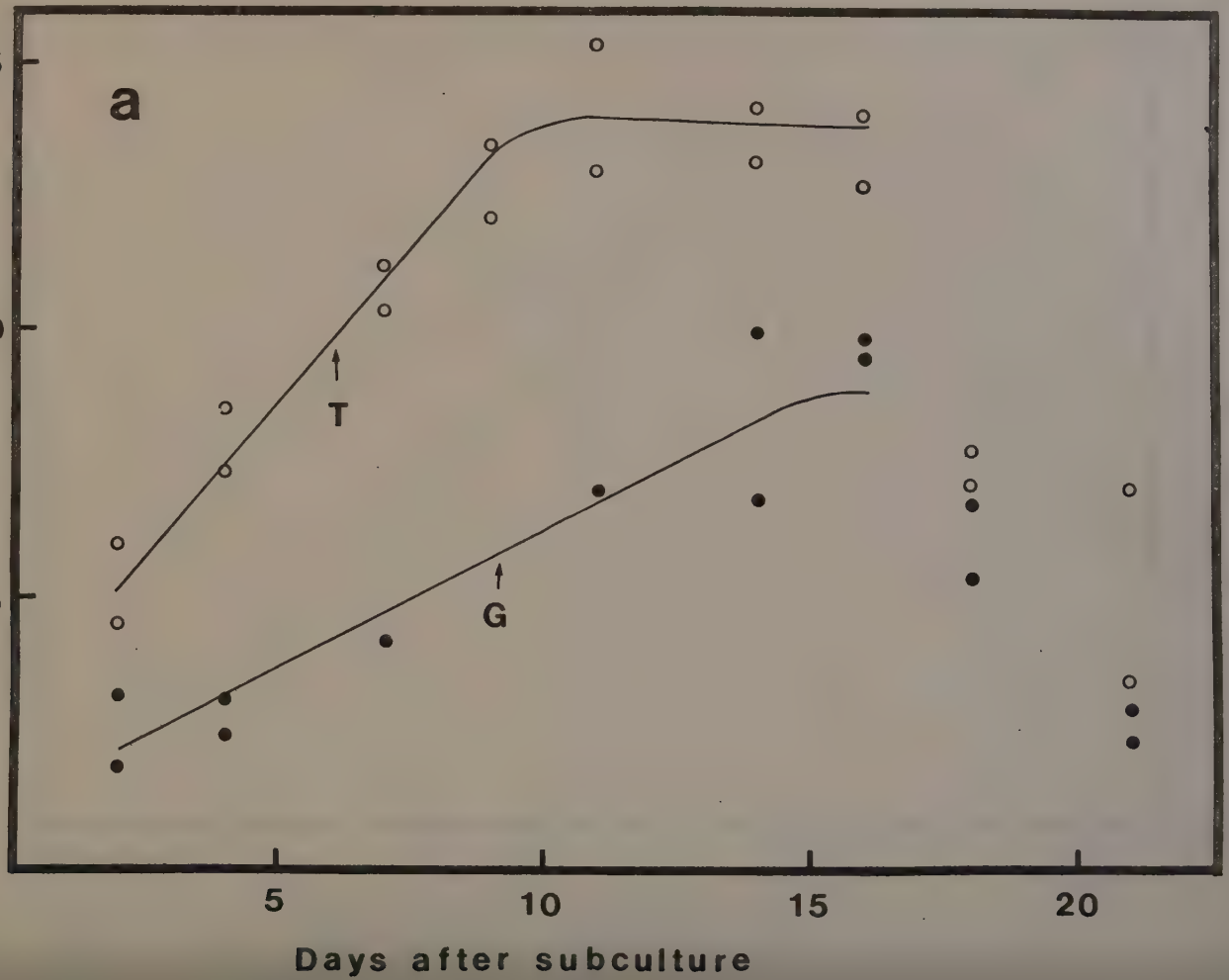


Abb. 4a

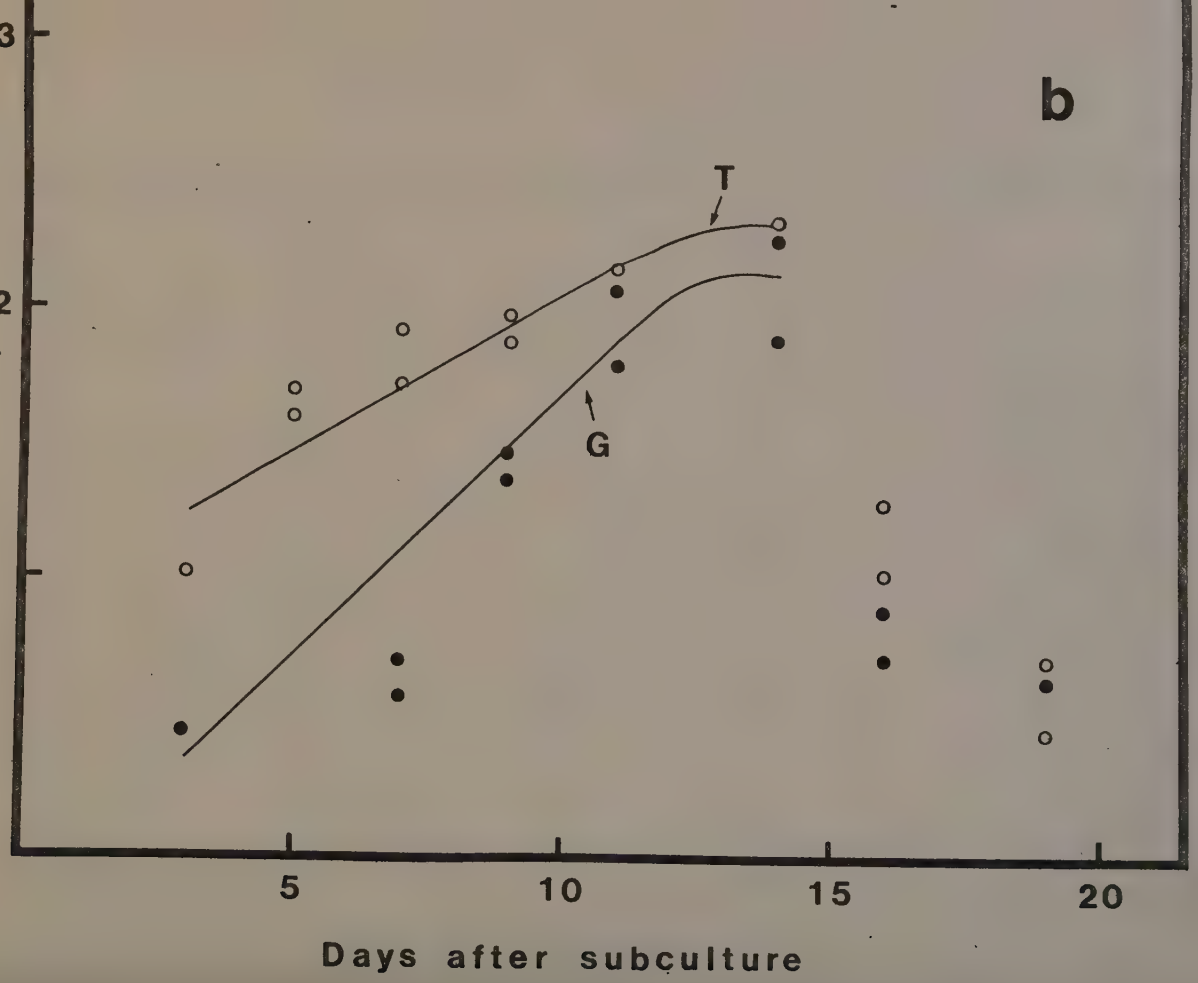
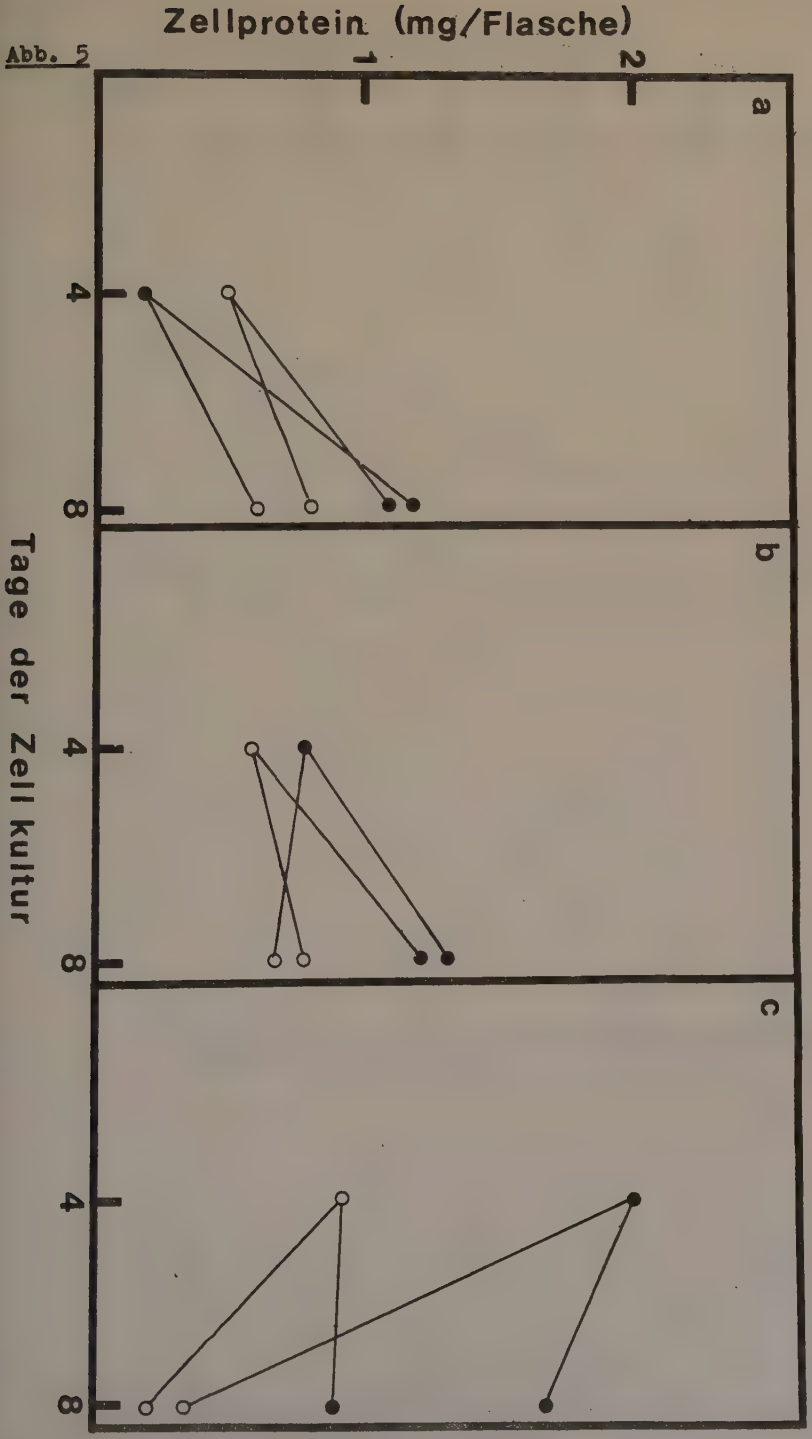


Abb. 4b

Abb. 5



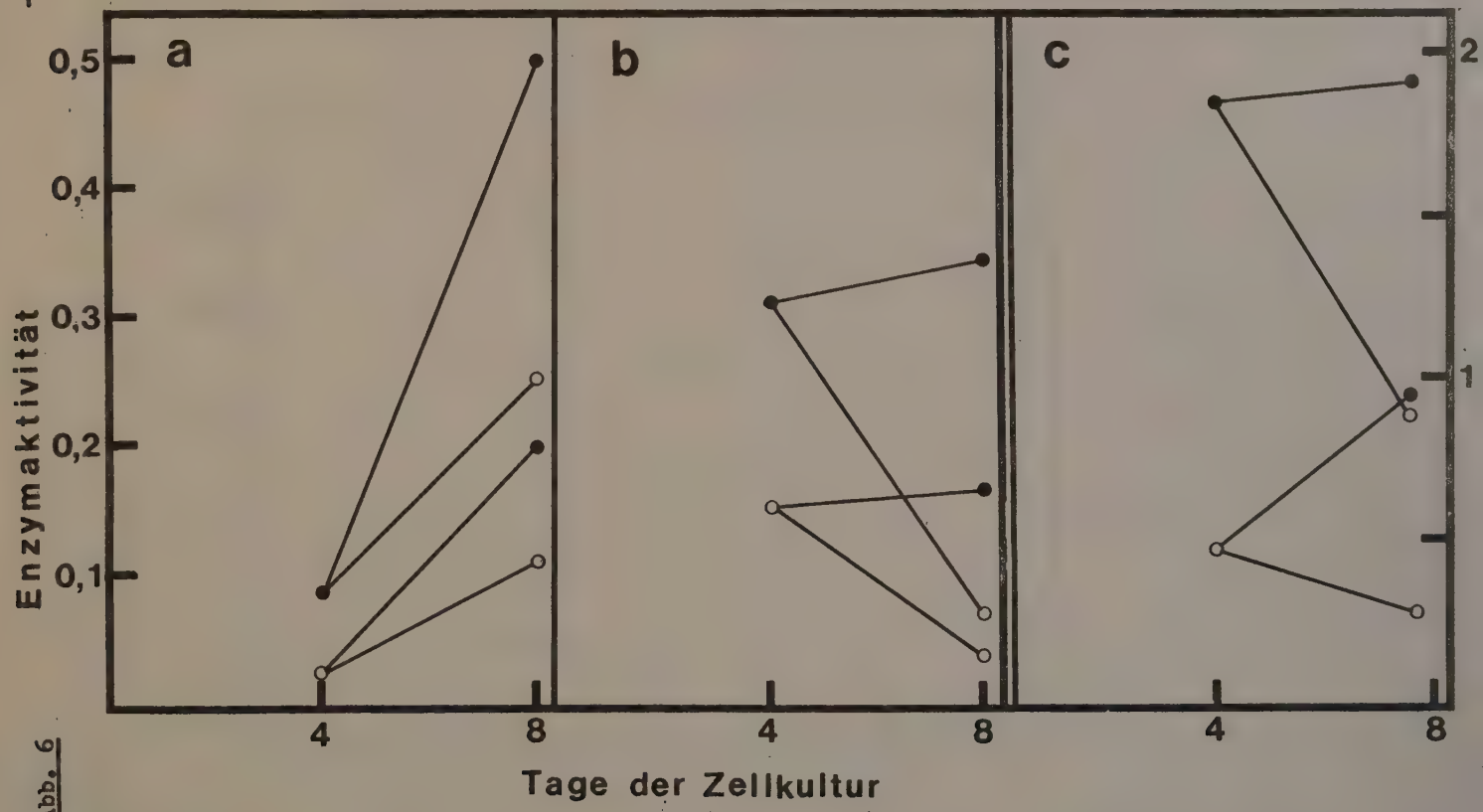
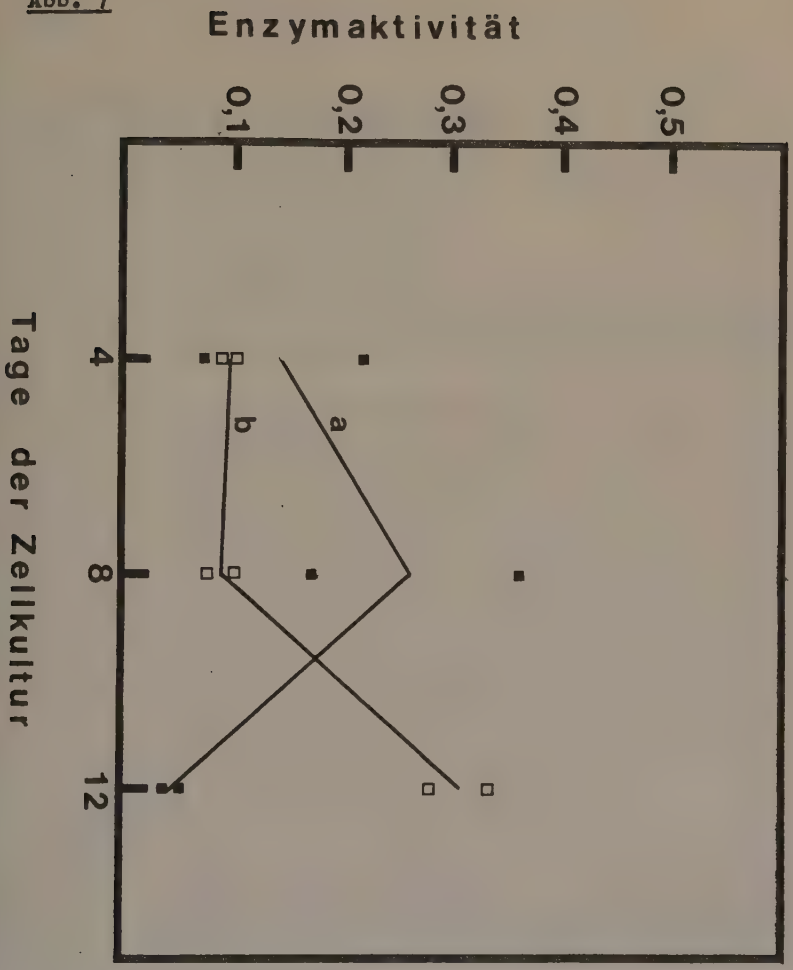

a
b
c
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
2
1
Enzymaktivität
4
8
4
8
4
8
Tage der Zellkultur

Abb. 6

Abb. 7



ERLÄUTERUNGEN ZU DEN ABBILDUNGEN

Abb. 1: Der Einfluß des pH auf die Enzymaktivität kultivierter Zellen und Leukozyten
a: Uridyltransferase
F = Fibroblasten; L = Leukozyten; A(e) = Amnionzellen mit vorwiegend epitheloidem Charakter; A(af) = Amnionzellen vom Amnionflüssigkeit-Zelltyp

Abb. 2: Lineweaver-Burk-Diagramme für die K_m-Werte der Uridyltransferase für Galactose-1-Phosphat (a) und UDP-Glucose (b). Die K_m-Werte für Galaktose-1-Phosphat wurden mit 0,5 mM UDP-Glucose (a) und diejenigen für UDP-Glucose mit 1,04 mM Galaktose-1-Phosphat bestimmt.
A = Amnionzellen; F = Fibroblasten; L = Leukozyten

Abb. 3: Zunahme des Zellproteins und der Enzymaktivität während des Wachstums von Amnionzellen (3a) und Fibroblasten (3b). Die Enzymaktivität ist als cpm im Reaktionsprodukt/Stunde/Flasche ausgedrückt.
T = Transferase; P = Zellprotein

Abb. 4: Spezifische Aktivität der Transferase (T) und der Galaktokinase (G) während des Wachstums von Amnionzellen (4a) und Fibroblasten (4b). Die spezifische Aktivität ist ausgedrückt als nmoles Reaktionsprodukt/Min/mg Protein

Abb. 5: Einfluß von Galaktose auf das Zellwachstum heterozygoter (a, b) und eines gesunden Probanden (c)
●-----● Wachstum in Glucose
o-----o Wachstum in Galaktose
●-----o Wechsel von Glucose auf Galaktose am 4. Tag
o-----● Wechsel von Galaktose auf Glucose am 4. Tag

Die Hexosekonzentrationen betragen jeweils 100 mg / 100 ml Medium.

Abb. 6: Einfluß von Galaktose auf das Enzymverhalten der Uridyltransferase bei zwei heterozygoten (a, b) und einem gesunden Probanden (c)

Die Enzymaktivität ist in nmoles Reaktionsprodukt / Min / mg Protein ausgedrückt (Symbole wie Abb. 5)

Abb. 7: Verhalten der Enzymaktivität (nmoles / Min / mg Protein) der Uridyltransferase eines heterozygoten Probanden in einem Medium mit 90 mg% Galaktose und 10 mg% Glucose (a) und in einem Medium mit 200 mg% Galaktose (b)

LEBENSLAUF

Geboren wurde ich am 17. Juni 1948 in Murnau (Obb.) als einziges Kind des Angestellten Harald Henseleit und seiner Frau Magdalena, geb. Schauder.

Nach vierjährigem Grundschulunterricht trat ich im Herbst 1958 in das Gymnasium Weilheim (Obb.) ein und verließ es nach abgelegter Reifeprüfung im Juni 1967.

Danach leistete ich 18 Monate Wehrdienst bei der Bundeswehr in Mittenwald und begann im Frühjahr 1969 eine zweijährige Ausbildung als Apotheker-Praktikant.

Nach dem Vorexamen arbeitete ich ein Jahr als Pharmazeutisch-Technischer-Assistent in einer Apotheke im Ruhrgebiet. Im Sommersemester 1972 begann ich dann das Medizinstudium in München und erhielt nach dem 3. Staatsexamen im Frühjahr 1979 die Approbation als Arzt.